

Original document

Method for the colorimetric determination of analyte using enzymatic oxydation.

Publication number: EP0354441

Publication date: 1990-02-14

Inventor: HOENES JOACHIM DR

Applicant: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)

Classification:

- international: **G01N33/68; C12Q1/26; C12Q1/32; G01N33/68; C12Q1/26; C12Q1/32;** (IPC1-7): C12Q1/26; C12Q1/54

- European:

Application number: EP19890114143 19890801

Priority number(s): DE19883826922 19880809

Also published as:

-  US5206147 (A1)
-  JP2174695 (A)
-  EP0354441 (A3)
-  DE3826922 (A1)
-  DD284050 (A5)
-  EP0354441 (B1)
-  RU2015513 (C1)
-  AU614405B (B2)

[less <<](#)[View INPADOC patent family](#)[View list of citing documents](#)[View document in the European Register](#) 

Cited documents:

-  US4105800
-  EP0120440
-  EP0296481
-  DE3820404
-  JP62019099

[Report a data error here](#)

Abstract of EP0354441

The invention relates to a method for the colorimetric determination of an analyte by means of enzymatic oxidation of the analyte in the presence of an electron acceptor and determination of the reduced electron acceptor by colour formation as a measure of the amount of the analyte, characterised in that the analyte is oxidised with an appropriate oxidoreductase in the presence of a substance from the group of compounds with nitrogen in an oxidation state between +1 and -1 as direct electron acceptor, and an agent suitable for this purpose.

.....
Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

Description of EP0354441

[Translate this text](#)

Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation des Analyten in Gegenwart eines Elektronenakzeptors und Bestimmung des reduzierten Elektronenakzeptors durch Farbbildung als Mass für die Menge des Analyten.

Weiter betrifft die Erfindung ein Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten durch enzymatische Oxidation des Analyten, enthaltend eine Oxidoreduktase und einen farbbildenden Elektronenakzeptor.

Die Erfindung erstreckt sich speziell auf die Verwandlung einer Substanz aus der Gruppe der Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen + 1 und - 1 als direkten Elektronenakzeptor eines Analyt/Oxidase-Systems oder eines Analyt/NAD(P)unabhängige Dehydrogenase-Systems.

Speziell betrifft die Erfindung die Verwendung einer Substanz aus der Gruppe der Nitrosoverbindungen, Hydroxylamine und Oxime als farbbildenden Elektronenakzeptor bei der Oxidation eines Analyten mittels einer Oxidoreduktase.

Enzymatische Oxidationen ermöglichen in der Analytik den Nachweis und die Bestimmung von Substanzen in verschiedensten Probenmaterialien. Hierbei wirkt ein oxidierendes Enzym in Gegenwart eines die Elektronen der Oxidationsreaktion aufnehmenden Akzeptors auf ein entsprechendes Enzymsubstrat ein. Die Reduktion des Elektronenakzeptors zeigt die Anwesenheit des Enzymsubstrats an. Hierbei hat es sich bisher als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn der reduzierte Elektronenakzeptor durch Farbbildung nachgewiesen werden kann, da dies nicht notwendigerweise nur mittels teurer Messapparaturen möglich ist, sondern gegebenenfalls auch visuell erfolgen kann.

Bekannte Methoden zur kolorimetrischen Bestimmung von Substanzen mittels oxidierend wirkender Enzyme verwenden Oxidasen oder Dehydrogenasen. Beide Enzymgruppen gehören zur Hauptgruppe der Oxidoreduktasen (Römpps Chemie-Lexikon, Franckh-sche Verlagshandlung, Stuttgart, 8. Auflage, 1985, Band 4, Seite 2952; Lexikon Biochemie, Hrsg. H. D. Jakubke, Verlag Chemie, Weinheim, 2. Auflage, 1981, Seite 194), deren Mitglieder nach ihren natürlichen Elektronenakzeptoren unterschieden werden können.

Natürlicher Elektronenakzeptor für Oxidasen ist molekularer Sauerstoff (Römpps Chemie-Lexikon, Franckh-sche Verlagshandlung, Stuttgart, 8. Auflage, 1985, Band 4, Seite 2946). Stellvertretend für den Stand der Technik des Einsatzes von Oxidasen zur kolorimetrischen Bestimmung von Analyten sei A. Kunst et al. in "Methods in enzymatic analysis", Hrsg. H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Auflage, 1984, Band 6, Seite 178 - 185 zitiert. Glucose wird dort in Serum, Plasma oder deproteiniertem Blut durch Umsetzung mit Glucose-Oxidase und Luftsauerstoff in wässriger Lösung nachgewiesen, indem das bei dieser Reaktion durch Reduktion des Sauerstoffs gebildete Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidase oxidierend und damit farbbildend auf ebenfalls in der Reaktionsmischung vorliegendes Phenol und 4-Aminophenazon wirkt. Als Fehlerquelle wird in dieser Literaturstelle selbst die Anwesenheit von reduzierend wirkenden Substanzen, wie Ascorbinsäure, Harnsäure oder Glutathion genannt. Störend wirken außerdem Übergangsmetallionen oder Häm und Häm-Proteine, wie sie leicht in von Blut abgeleiteten Proben auftreten können, weil sie Wasserstoffperoxid zersetzen. Auch Probeninhaltsstoffe, die mit Wasserstoffperoxid und Peroxidase und gegebenenfalls weiteren im Nachweisreagenz enthaltenen Substanzen, wie z. B. Phenol oder 4-Aminophenazon zu einer Farbbildung führen, können zu falschen Resultaten führen, Solche Stoffe können z. B. Bilirubin oder auch Medikamente, wie z. B. -Methyldopa sein, die durchaus in von Blut abgeleiteten Proben oder in Urin vorkommen können.

In J. Siedel et al. in "Methods in enzymatic analysis", Hrsg. H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Auflage, 1984, Band 8, Seite 139 - 148, wird die kolorimetrische Bestimmung von Gesamtcholesterin in Serum oder Plasma derart beschrieben, dass zunächst estergebundenes Cholesterin mit Cholesterin-Esterase freigesetzt wird. Dann wird Cholesterin durch Umsetzung mit Cholesterin-Oxidase und Luftsauerstoff in wässriger Lösung bestimmt, wobei das bei dieser Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidase oxidierend und damit farbbildend auf ebenfalls in der Reaktionsmischung vorliegendes Phenol und 4-Aminoantipyrin wirkt. Die Farbbildung ist ein Mass für die Menge an Gesamtcholesterin in der Probe.

Sämtliche für das vorstehend genannte Verfahren zur Bestimmung von Glucose mittels Oxidase genannten Nachteile treffen in gleichem Masse für die beschriebene Cholesterin-Bestimmungsmethode zu. Diese Nachteile sind unabhängig davon, ob die Nachweisreaktion z. B. in einer Küvette oder auf einem Trockenreagenzträger, wie sie z. B. aus EP-A-0 016 387, DE-A-32 47 608, EP-A-0 262 445 oder EP-A-0 256 806 bekannt sind, durchgeführt wird. Insbesondere bei Durchführung der vorgenannten Bestimmungsmethoden auf festen Trägern, in sogenannten Trockentests, hat sich der Sauerstoffbedarf zusätzlich als nachteilig erwiesen. Vor allem dann, wenn viel Sauerstoff zur Oxidation hoher Konzentrationen an Enzymsubstrat gebraucht wird, kann die Diffusion von Sauerstoff aus der Luft in das Reaktionsmedium zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden und zu langen Reaktionszeiten oder insbesondere bei kinetischen Bestimmungsmethoden zu falschen Ergebnissen führen.

Dehydrogenasen können ganz allgemein in solche unterteilt werden, die für die Oxidation von Enzymsubstraten Nikotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) oder Nikotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) als natürlichen unmittelbaren Elektronenakzeptor benötigen und in solche, die nicht NAD- oder NADP-abhängig sind und die also andere Substanzen als natürliche unmittelbare Elektronenakzeptoren bei enzymatischen Oxidationsreaktionen verwenden.

Der Einsatz von Dehydrogenasen für kolorimetrische Messungen ist z. B. aus DE-A-21 47 466 bekannt. Dort wird beschrieben, dass Lactat unter Katalyse von Lactat-Dehydrogenase mit Nikotinamidadenin-dinucleotid zu Pyruvat und reduziertem Nikotinamid-adenin-dinucleotid umgesetzt wird. Das gebildete NADH reagiert dann beispielsweise in Gegenwart des Enzyms Diaphorase mit Tetrazoliumsalzen unter Bildung von NAD und farbigen Formazanen, deren Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Anstatt Diaphorase ist auch N-Methylphenazinium-methosulfat als Reduktionskatalysator für die Übertragung der Elektronen von NADH auf das Tetrazoliumsalz genannt.

Nachteile dieses Verfahrens sind darin zu sehen, dass statt NADH auch andere eventuelle in biologischen Proben, wie z. B. Blut, Serum, Plasma oder Urin vorkommende, reduzierende Substanzen, wie Glutathion oder Medikamente, wie Methyldopa oder Dobesylat in Gegenwart von Reduktionskatalysatoren, wie Diaphorase oder N-Methylphenazinium-methosulfat Tetrazoliumsalze in entsprechende Formazane überführen und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Die Notwendigkeit von Reduktionskatalysatoren, wie Diaphorase oder Phenaziniummethosulfat für die Übertragung der durch die Oxidation eines Analyten freiwerdenden Elektronen vom Analyt/Enzymsystem auf einen der Farbbildung dienenden Elektronenakzeptor birgt außerdem den Nachteil in sich, dass dadurch auch andere Probenbegleitstoffe reduziert werden können, die unter sonst gleichen Bedingungen keine Reduktion eingingen, so aber zu falsch-negativen Resultaten führen.

Den vorgenannten Nachteilen des Standes der Technik will die Erfindung Abhilfe schaffen. Der Erfindung lag speziell die Aufgabe zugrunde, für die Analytik insbesondere von biologischen Flüssigkeiten ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation des Analyten in Gegenwart eines Elektronenakzeptors und Bestimmung des Elektronenakzeptors durch Farbbildung als Mass für die Menge des Analyten bereitzustellen, bei dem reduzierend wirkende, insbesondere Wasserstoffperoxid zersetzende Begleitstoffe in Proben insbesondere biologischen Proben, wie von Blut abgeleiteten Flüssigkeiten, z. B. Serum oder in Urin nicht stören, die Verwendung von Reduktionskatalysatoren, wie Diaphorase oder N-Methylphenazinium-methosulfat vermieden, für das kein Sauerstoff erforderlich ist und das dadurch auch bei hohen Substratkonzentrationen schnelle Farb-Endwerte ermöglicht.

Außerdem sollte ein Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten durch enzymatische Oxidation des Analyten, enthaltend eine Oxidoreduktase und einen farbbildenden Elektronenakzeptor zur Verfügung gestellt werden, welches für die Durchführung des vorstehend genannten Verfahrens geeignet ist.

Im einzelnen erstreckt sich die Aufgabe auf die Auswahl solcher Substanzen, die als farbbildende Elektronenakzeptoren für ein verbessertes Verfahren und Mittel wie oben angegeben eingesetzt werden können.

Die Aufgabe wird durch die Erfindung, wie sie in den Ansprüchen charakterisiert ist, gelöst.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation des Analyten in Gegenwart eines Elektronenakzeptors und Bestimmung des reduzierten Elektronenakzeptors durch

Farbbildung als Mass für die Menge des Analyten gefunden, das dadurch gekennzeichnet ist, dass der Analyt mit einer entsprechenden Oxidoreduktase in Anwesenheit einer Substanz aus der Gruppe der Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen + 1 und - 1 als direktem Elektronenakzeptor oxidiert wird.

Ausserdem wurde ein Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten durch enzymatische Oxidation des Analyten, enthaltend eine Oxidoreduktase und einen farbbildenden Elektronenakzeptor gefunden, das dadurch gekennzeichnet ist, dass der farbbildende Elektronenakzeptor eine direkt mit dem Analyt/Enzym-System reagierende Substanz aus der Gruppe der Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen + 1 und - 1 ist.

Speziell wurde gefunden, dass die Verwendung einer Substanz aus der Gruppe der Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen + 1 und - 1 als direkter Elektronenakzeptor eines Analyt/Oxidase-Systems oder eines Analyt/NAD(P)-unabhängigen Dehydrogenase-Systems besonders geeignet ist.

Erfundungsgemäss wird unter "Analyt" eine solche Substanz verstanden, die enzymatisch oxidiert wird. In vielen Fällen wird der Analyt diejenige Substanz sein, die in der zu untersuchenden Probe direkt nachgewiesen oder quantitativ bestimmt werden soll. Beispielsweise kann Glucose direkt mit Glucoseoxidase oxidiert und kolorimetrisch bestimmt werden. Es ist jedoch auch möglich, dass der Analyt erst durch eine oder mehrere vorgeschaltete Reaktionen aus einer anderen Substanz gebildet wird und so aus der Anwesenheit und Konzentration des Analyten indirekt auf die Anwesenheit und Konzentration der Ausgangssubstanz geschlossen werden kann. So kann z. B. Glycerin so nachgewiesen und bestimmt werden, dass in einer ersten Reaktion Glycerin mittels Glycerinkinase und Adenosintriphosphat in Glycerin-3-phosphat und Adenosin-diphosphat überführt wird und dann anschliessend in einer zweiten Reaktion Glycerin-3-phosphat mit Glycerin-3-phosphat-oxidase oxidiert wird. Glycerin-3-phosphat ist in diesem Fall der Analyt, dessen Konzentration derjenigen der zu bestimmenden Substanz, nämlich Glycerin, entspricht. Der Analyt ist jedoch auch hier diejenige Verbindung, die kolorimetrische bestimmt wird.

Der Analyt ist in der vorliegenden Erfindung diejenige Substanz, die als Substrat des jeweiligen oxidierenden Enzyms akzeptiert wird. Damit der Analyt oxidiert wird, muss gleichzeitig ein Elektronenakzeptor zugegen sein, der die Elektronen unter Mitwirkung des Enzyms von dem Analyten übernimmt.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass Substanzen aus der Gruppe der Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen + 1 und - 1, bevorzugt solche mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe von + 1 oder - 1, farbbildende Elektronenakzeptoren für oxidierende Enzyme sein können.

Unter "farbbildend" wird in diesem Zusammenhang verstanden, dass der Elektronenakzeptor nach Reduktion entweder unmittelbar selbst in einer anderen Farbe vorliegt als vor der enzymatischen Oxidation des Analyts oder dass der reduzierte Akzeptor selbst zwar nicht direkt zu einer Farberzeugung führt, er in einer Folgereaktion aber ursächlich zu einer Farbänderung der Reaktionsmischung führt. Farbänderung umfasst hierbei sowohl den Wechsel von farblos nach farbig als auch von einer Farbe zu einer anderen. Für die Farbbildung durch Folgereaktionen sind dem Fachmann viele Möglichkeiten bekannt, aus denen er je nach den Gegebenheiten auswählen kann. Beispielsweise seien hier genannt solche Reaktionen, bei denen der reduzierte Elektronenakzeptor selbst Teil einer farbigen Verbindung wird, wie oxidative Kupplungsreaktionen. Farbbildende Folgereaktionen können aber auch solche sein, bei denen der reduzierte Elektronenakzeptor durch seine reduzierende Wirkung auf eine andere Substanz zu einer Farbänderung derselben führt.

Unter Oxidationsstufe wird ein Zahlenwert verstanden, der den Oxidationszustand eines bestimmten Atoms in einer Verbindung, die ein neutrales Molekül oder ein geladenes Komplexion sein kann, kennzeichnet. Dem Fachmann ist die Ermittlung von Oxidationsstufen bekannt. Anleitungen zur Bestimmung dieses Zahlenwertes sind grundlegenden Lehrbüchern der Chemie, wie z. B. "Anorganische Chemie", Hofmann & Rüdorff, Verlag F. Vieweg & Sohn, Braunschweig, 20. Auflage, 1969, Seite 216 - 218; "Lehrbuch der anorganischen Chemie", Hollemann-Wiberg, Verlag Walter deGruyter & Co., Berlin, 71. - 80. Auflage, 1971, Seite 197 - 199 oder "Anorganikum", Hrsg. L. Kolditz, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 4. Auflage, 1972, Seite 446 zu entnehmen.

Erfundungsgemäss bevorzugte Elektronenakzeptoren sind N-Oxide, Nitrosoverbindungen, Hydroxylamine und Oxime. Besonders bevorzugt sind N-Oxide, Nitrosoverbindungen und Oxime.

Vor allem solche N-Oxide sind vorteilhaft einsetzbar, bei denen das das Sauerstoffatom tragende Stickstoffatom des N-Oxids Teil eines aromatischen Ringsystems ist. Beispiele hierfür sind Resazurin oder Resazurin-Derivate, wie sie beispielhaft in EP-A-0 156 347 beschrieben sind. Hierin besitzt das Stickstoffatom des N-Oxids die Oxidationszahl - 1.

Resazurin und Resazurin-Derivate werden als Elektronenakzeptoren bei enzymatischen Oxidationen zu Resorufinen bzw. Resorufin-Derivaten reduziert. Damit ist ein deutlicher Farbwechsel verbunden. So ist z. B. Resazurin blau und Resorufin rot gefärbt.

Weiter können als vorteilhaft einsetzbare aromatische N-Oxide solche von Benzfuroxan oder Benzfuroxan-Derivaten genannt werden, deren kohlenstoffaromatische Teilstruktur durch niedermolekulare Ringsubstituenten substituiert sein können. Niedermolekulare Ringsubstituenten können in diesem Zusammenhang solche mit einem Molekulargewicht bis etwa 400 Dalton sein.

Besonders bevorzugte Benzfuroxane werden beispielsweise durch allgemeine Formel I wiedergegeben: EMI8.1 in der R<1> und R<2> gleich oder verschieden sein können und Wasserstoff, Niederalkyl, Niederalkoxy, Niederalkylcarbonyl oder Formyl bedeuten.

In diesen Verbindungen besitzt das Stickstoffatom des N-Oxids die Oxidationsstufe + 1.

Niederalkyl und Niederalkoxy sind Reste mit 1 - 5 Kohlenstoffatomen. Besonders bevorzugt sind Methyl bzw. Methoxy.

Unter Niederalkylcarbonyl werden solche Reste verstanden, die im Alkylrest 1 - 5 Kohlenstoffatome enthalten. Besonders bevorzugt ist Acetyl.

Bei Einsatz der vorgenannten Benzfuroxane der allgemeinen Formel I als Elektronenakzeptoren bei enzymatischen Oxidationen werden die farblosen Verbindungen zu farbigen Verbindungen reduziert. Im wesentlichen erfolgt die Bildung orangegefärbter Verbindungen.

Für das erfindungsgemäße Verfahren können die vorstehen genannten aromatischen N-Oxide als direkte Farbindikatoren für die enzymatische Oxidation eines Analyten eingesetzt werden. Hierzu wird das oxidierende Enzym zusammen mit dem aromatischen N-Oxid mit der zu untersuchenden Probe in Kontakt gebracht. Enthält die Probe einen Analyten, der durch das Enzym oxidiert werden kann, dient das N-Oxid als Elektronenakzeptor, das durch Reduktion seine Farbe ändert und so die Anwesenheit des Analyten in der Probe anzeigt. Aus der Intensität der neu gebildeten Farbe kann auf die Konzentration des Analyten in der Probe geschlossen werden.

Geeignete Nitrosoverbindungen, die für das erfindungsgemäße Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten einsetzbar sind, sind vorzugsweise solche, die den Nitrosorest an eine aromatische Gruppe gebunden enthalten.

Besonders bevorzugt sind kohlenstoffaromatische Nitrosoverbindungen, wie Nitrosobenzol und Nitrosobenzol-Derivate. Als Nitrosobenzol-Derivate sind hierbei alle diejenigen für das erfindungsgemäße Verfahren ganz hervorragend geeignet, die durch Reduktion in solche Verbindungen überführt werden, die zur Farbbildung im Sinne der zuvor gegebenen Erläuterung dienen können.

Nitrosobenzol und Nitrosobenzol-Derivate sind in der Regel schwach farbige, gelb, grün oder braun gefärbte Substanzen, die im reduzierten Zustand nicht gefärbt sind. Sie müssen deshalb, um einen Analyten kolorimetrisch nachweisen zu können, in einer Folgereaktion zu einer Farbbildung führen. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, dass die reduzierte Nitrosoverbindung mit einer anderen Substanz so umgesetzt wird, dass eine farbige Substanz erhalten wird, die die reduzierte Nitrosoverbindung als Teilstruktur enthält.

Oxidative Kupplungsreaktionen sind eine Möglichkeit für diese Art der Farbbildung. Deswegen sind insbesondere solche Nitrosobenzol-Derivate für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet, die nicht nur als Elektronenakzeptoren für oxidierende Enzyme wirken, sondern die auch im reduzierten Zustand für oxidative Kupplungsreaktionen einsetzbar sind.

Ganz besonders bevorzugt sind Nitrosobenzol-Derivate der allgemeinen Formel II EMI10.1 in der

R eine Hydroxygruppe oder eine Aminogruppe bedeuten, wobei die Aminogruppe ein- oder zweifach durch Niederalkyl substituiert sein und die Niederalkylgruppe ihrerseits durch eine Hydroxygruppe, eine ein- oder mehrfach durch Niederalkyl substituierte Aminogruppe, PO₃H₂, SO₃H oder CO₂H substituiert sein kann.

Hervorragend geeignet sind insbesondere solche Nitrosobenzol-Derivate der allgemeinen Formel II, die schwer flüchtig sind.

Niederalkyl bedeutet in vorstehender Definition einen Alkylrest mit 1 - 5 Kohlenstoffatomen. Besonders bevorzugt sind Methyl und Ethyl.

Die Säurereste PO₃H₂, SO₃H und CO₂H können als solche oder in Salzform als Ammonium-, Alkali- oder Erdalkalisalze vorliegen. Ammoniumsalze sind solche, die das unsubstituierte Ammoniumkation NH₄⁺ enthalten oder solche, die ein- oder mehrfach durch Niederalkyl, Aryl oder/und Niederalkylaryl substituierte Ammoniumkationen enthalten. Niederalkyl bedeutet jeweils ein 1 - 5 Kohlenstoffatome enthaltender Alkylrest. Der Arylrest ist ein 6 - 10 Kohlenstoffatome zählendes aromatisches Ringsystem.

Als Niederalkyl werden Methyl und Ethyl bevorzugt. Bevorzugter Arylrest ist Phenyl, wobei Benzyl ein bevorzugter Niederalkylarylrest ist.

Als Elektronenakzeptoren für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich p-Hydroxy-nitrosobenzol, p-Dimethylamino-nitrosobenzol, p-Diethylamino-nitrosobenzol und p-Dihydroxyethylamino-nitrosobenzol ganz hervorragend.

Wie vorstehend ausgeführt, werden für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt Nitrosobenzol oder Nitrosobenzol-Derivate, in denen Stickstoff in der Oxidationsstufe + 1 vorliegt, mit der zu untersuchenden Probe und einem oxidierenden Enzym in Kontakt gebracht. Bei Anwesenheit eines Analyten in der Probe, der als Enzymsubstrat akzeptiert wird, fungiert Nitrosobenzol oder ein Nitrosobenzolderivat als Elektronenakzeptor und wird dadurch zum entsprechenden Amin reduziert. In der Regel reicht diese Reduktion der Nitrosoverbindungen allein nicht für eine kolorimetrische Bestimmung des Analyten aus, da entweder nur Farbabnahmen auftreten oder Farbänderungen nur schwach wahrnehmbar sind. Der reduzierte Elektronenakzeptor kann aber als Ausgangsmaterial für eine oxidative Kupplungsreaktion dienen, wobei je nach Wahl des Kupplungspartners die unterschiedlichsten Farben erhalten werden können.

Oxidative Kupplungsreaktionen sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in EP-A-0 175 250 oder in H. Hünig et al., Angewandte Chemie 70, 215 - 222 (1958) beschrieben. Allgemein werden oxidative Kupplungen häufig zur Herstellung von Farbstoffen angewandt. Sie können in diesem Zusammenhang als Reaktion zwischen einer elektronenreichen aromatischen Verbindung und einer oxidablen Kupplungskomponente aufgefasst werden, die in Gegenwart von Oxidationsmitteln, wie z. B. Natrium- oder Kaliumhexacyanoferrat(III), Kupfersalzen, Quecksilbersalzen, Eisen(III)chlorid, Bleidioxid, Wasserstoffperoxid, Bleitetraacetat, Natrium- oder Kaliumsalzen der Perschwefelsäure, Peressigsäure, Perjodsäure oder Chloramin T ablaufen. Gemäß DE-A 33 31 588 lassen sich auch Oxidasen als Oxidationsmittel verwenden. Die vorstehend beschriebenen Nitrosobenzole stellen in ihrem reduzierten Zustand, nachdem sie als Elektronenakzeptoren in enzymatischen Oxidationen gewirkt haben, Verbindungen dar, die als oxidabile Kupplungskomponenten für oxidative Kupplungsreaktionen zur Verfügung stehen. Hierfür können die durch die Reduktion entstandenen Amine durch Oxidationsmittel, wie sie vorstehend beispielhaft genannt sind, oxidiert werden, um mit gleichzeitig in der Reaktionsmischung anwesenden elektronenreichen Kupplungskomponenten einen Farbstoff zu bilden.

Dem Fachmann stehen eine Vielzahl elektronenreicher Kupplungskomponenten zur Verfügung. Diese Kupplungskomponenten sind je nach der gewünschten Farbe des Kupplungsproduktes wählbar. Beispiele sind aromatische Amine, Phenole oder methylenaktive Verbindungen. Besonders bevorzugte Verbindungen können aus der Gruppe der Aniline, z. B. N-Methylantranilsäure und den in EP-A-0 175 250 genannten Anilinophosphonsäuren gewählt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des reduzierten Elektronenakzeptors durch Farbbildung besteht im Falle der

Nitrosoverbindungen darin, die reduzierte Nitrosoverbindungen durch andere Substanzen zu oxidieren, die ihrerseits aufgrund dieses Übergangs von der oxidierten in die reduzierte Form eine Farbe bilden, wobei auch hier unter Farbbildung sowohl die Übergänge von einer Farbe in die andere ebenso wie vom farblosen zum farbigen Zustand verstanden werden sollen. Beispiele für solche Farbbildungsreaktionen sind z. B. die Oxidation des reduzierten Elektronenakzeptors mittels Metallsalzen, die hierbei zu farbigen Metallsalzen mit dem Metall in einer niedrigeren Oxidationsstufe oder eventuell ganz bis zum neutralen Metall reduziert werden. Kupfer(II)-salze können beispielsweise in rote Kupfer(I)-salze und Silbersalze in metallisches Silber überführt werden. Möglich ist auch die Reduktion von Phosphormolybdat zu Molybdänblau.

Anstelle von aromatischen Nitrosoverbindungen können für das erfindungsgemäße Verfahren auch aromatische Oxime als Elektronenakzeptoren für enzymatische Oxidation eingesetzt werden. Nitrosoverbindungen können mit Oximen in einem tautomeren Gleichgewicht stehen. Diese ist insbesondere der Fall, wenn hierfür ein Wasserstoffatom in alpha-Position zur Nitrosogruppe zur Verfügung steht EMI13.1 oder wenn eine entsprechende Delokalisation der Elektronen und Protonen möglich ist.

Es wurde gefunden, dass Oxime, die mit Nitrosoverbindungen, welche als Elektronenakzeptoren in enzymatischen Oxidationsreaktionen funktionieren, in einem tautomeren Nitroso/Oxim-Gleichgewicht stehen können, ebenfalls in erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Insbesondere trifft dies zu für Oxime der allgemeinen Formel III EMI14.1 in der

R min Sauerstoff, eine weitere Oximgruppe oder eine positiv geladene Aminogruppe bedeuten, wobei die Aminogruppe ein- oder zweifach durch Niederalkyl substituiert sein und die Niederalkylgruppe ihrerseits durch eine Hydroxygruppe eine ein- oder mehrfach durch Niederalkyl substituierte Aminogruppe, PO₃H₂, CO₂H oder SO₃H substituiert sein kann.

Niederalkyl bedeutet in vorstehender Definition einen Alkylrest mit 1 - 5 Kohlenstoffatomen. Besonders bevorzugt sind Methyl und Ethyl.

Die Säurereste PO₃H₂, SO₃H und CO₂H können als solche oder in Salzform als Ammonium-, Alkali- oder Erdalkalisalze vorliegen.

Ammoniumsalze sind solche, die das unsubstituierte Ammoniumkation NH₄⁺ enthalten oder solche, die ein- oder mehrfach durch Niederalkyl, Aryl oder/und Niederalkylaryl substituierte Ammoniumkationen enthalten. Niederalkyl bedeutet jeweils einen 1 - 5 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkylrest. Der Arylrest ist ein 6 - 10 Kohlenstoffatome zählendes aromatisches Ringsystem.

Als Niederalkyl werden Methyl und Ethyl bevorzugt. Bevorzugter Arylrest ist Phenyl, wobei Benzyl ein bevorzugter Niederalkylarylrest ist.

In solchen Oximen besitzt Stickstoff die Oxidationsstufe - 1.

Ebenso wie Nitrosobenzol sind auch die Oxime der allgemeinen Formel III farblose oder gefärbte Substanzen, die im reduzierten Zustand nicht gefärbt sind. Wie vorstehend für Nitrosobenzole als Elektronenakzeptoren im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben, können auch aromatische Oxime nach ihrer Funktion als Elektronenakzeptoren zur Farbbildung gebracht werden. Sowohl Nitrosoverbindungen wie auch Oxime ergeben bei erschöpfender Reduktion Amine. Für Oxime als Elektronenakzeptoren sind in dem erfindungsgemäßen Verfahren grundsätzlich die gleichen Folgereaktionen zur Farbbildung anwendbar wie für Nitrosoverbindungen.

Hydroxylamine, die für das erfindungsgemäße Verfahren als Elektronenakzeptoren eingesetzt werden können, sind vorzugsweise ebenfalls aromatische Verbindungen. Insbesondere im Phenylring substituierte Derivate von Phenylhydroxylamin sind als Elektronenakzeptoren für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet. In diesen Verbindungen besitzt das Stickstoffatom die Oxidationszahl - 1.

Ganz besonders bevorzugte Phenylhydroxylamine sind solche der allgemeinen Formel IV EMI15.1 in der R sec die gleiche Bedeutung hat wie R in der allgemeinen Formel II.

Auch Hydroxylamine werden durch Reduktion in die entsprechenden Amine überführt, die nicht wesentlich gefärbt sind. Wie für Nitrosoverbindungen und Oxime beschrieben, müssen sich deshalb an die Oxidation des Analyts und die damit verbundene Reduktion des Elektronenakzeptors nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Folgereaktionen anschliessen, die ausgehend von dem reduzierten Elektronenakzeptor zu einer Farbbildung führt. Grundsätzlich gilt hierfür das gleiche wie für den Einsatz von Nitrosoverbindungen oder Oximen als Elektronenakzeptoren in dem erfindungsgemäßen Verfahren bereits ausgeführt. Ausgangsverbindung für alle diese Folgereaktionen sind die zur Stufe des Amins reduzierten Elektronenakzeptoren der enzymatischen Oxidation.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen + 1 und - 1, vorzugsweise solche mit einer Oxidationsstufe von + 1 oder - 1, insbesondere die Verbindungen aus der Gruppe der N-Oxide, Nitrosoverbindungen, Oxime und Hydroxylamine und ganz besonders die Verbindungen aus der Gruppe der N-Oxide, Nitrosoverbindungen und Oxime, wie sie vorstehend beschrieben sind, als farbbildende Elektronenakzeptoren für viele enzymatische Oxidationen dienen können, die durch Oxidoreduktasen katalysiert werden. Bevorzugt sind sie dort einsetzbar, wo für die Elektronenübertragung von zu oxidierenden Analyten auf den farbbildenden Elektronenakzeptor keine Reduktionskatalysatoren, wie Diaphorase oder N-Methylphenazinium-methosulfat gewünscht werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass diese Substanzen vorteilhaft sind, wenn Oxidasen oder nicht-NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen als oxidierende Enzyme eingesetzt werden. Werden solche Enzyme für die Oxidation eines Analyten verwendet, kann die Elektronenübertragung direkt, d. h. ohne Mitwirkung eines Reduktionskatalysators von dem Analyt/Enzym-System auf die vorgenannten farbbildenden Elektronenakzeptoren erfolgen. Als Analyt/Enzym-System wird in diesem Zusammenhang die für die Oxidationsreaktion notwendige Kombination aus Analyt und oxidierendem Enzym sowie gegebenenfalls zusammen mit für die Oxidation natürlicherweise notwendigen mit dem Enzym zusammenwirkenden Coenzymen und/oder Cofaktoren, wie beispielsweise Metallsalzen, verstanden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren sind flavinabhängige Oxidasen besonders bevorzugt. Beispiele sind L- und D-Aminosäure-Oxidasen Cholesterin-Oxidase, Glucose-Oxidase, Glycerin-3-phosphat-Oxidase, Lactat-Oxidase und Pyruvat-Oxidase. Oxidasen, die erfindungsgemäß ganz besonders geeignet sind, sind Glucose-Oxidase, Glycerin-3-phosphat-Oxidase, Lactat-Oxidase und Pyruvat-Oxidase.

Von den nicht-NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen sind Pyrrolochinolin-chinon(PQQ)-abhängige Dehydrogenasen für das erfindungsgemäße Verfahren besonders vorteilhaft einsetzbar. Insbesondere Glucose-Dehydrogenase eignet sich gut zur kolorimetrischen Bestimmung von Glucose bei Anwesenheit von Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen + 1 und - 1 als farbbildenden Elektronenakzeptoren. Ebenso kann nicht-NAD(P)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase zur Bestimmung von Alkohol, wie Ethanol, eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird so durchgeführt, dass die zu untersuchende Probe mit einer geeigneten Oxidoreduktase und einem oder mehreren der vorstehend beschriebenen farbbildenden Elektronenakzeptoren kontaktiert wird. Enthält die Probe einen Analyten, der von der Oxidoreduktase oxidiert wird, wird der farbbildende Elektronenakzeptor reduziert. Weist der reduzierte Elektronenakzeptor eine andere Farbe auf als der ursprüngliche Elektronenakzeptor in seiner oxidierten Form oder ging der Elektronenakzeptor durch den enzymatischen Oxidationsvorgang vom farblosen Zustand in einen gefärbten über, kann die Intensität der gebildeten Farbe direkt visuell, eventuell durch Vergleichsfarben oder photometrisch mit der Konzentration des Analyten in der Probe korreliert werden. Ist die Farbe des reduzierten Elektronenakzeptors im wesentlichen die gleiche wie die des ursprünglich eingesetzten Elektronenakzeptors oder findet eine Farbleiche oder völlige Entfärbung statt, so wird eine Folgereaktion an die enzymatische Oxidationsreaktion angeschlossen, die zu einer Farbe führt, aus deren Intensität visuell oder photometrisch ebenfalls die Konzentration des Analyten in der Probe ermittelt werden kann.

Das Verfahren kann in einem sogenannten Nasstest, z. B. in einer Küvette oder als sogenannter Trockentest auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden, wobei die notwendigen Testreagenzien auf einem festen Träger, insbesondere einem saugfähigen oder quellbaren Material vorliegen. Solche Testträger sind z. B. aus EP-A-0 016 387, DE-A-32 47 608, EP-A-0 262 445 oder EP-A-0 256 806 bekannt.

Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wie sie in den Ansprüchen gekennzeichnet sind, sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Ein solches Mittel enthält neben der

für die enzymatische Oxidation des zu bestimmenden Analyten notwendigen Oxidoreduktase mindestens einen farbbildenden Elektronenakzeptor, der die bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen direkt von dem Analyt/Enzym-System übernimmt. Als oxidierende Enzyme und farbbildende Elektronenakzeptoren werden die vorstehend für das erfundungsgemäße Verfahren beschriebenen Stoffe eingesetzt.

Zur Einhaltung eines für die Durchführung des Verfahrens geeigneten pH-Wertes, der sich insbesondere nach den einzusetzenden Enzymen richtet, enthält das erfundungsgemäße Mittel ein Puffersystem. Ausserdem kann es weitere geeignete üblicherweise für solche Mittel verwendete Zusatzstoffe, wie beispielsweise Netzmittel, Stabilisatoren etc. enthalten. Führt die Oxidation des Elektronenakzeptors nicht zu einer messbaren Farbänderung, schliesst das erfundungsgemäße Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten natürlich auch die für eine Folgereaktion erforderlichen Reagenzien ein.

Das erfundungsgemäße Mittel kann in Form einer Lösung oder auf einen saugfähigen oder quellbaren Träger aufgezogen vorliegen. In Form einer Lösung enthält das Mittel vorzugsweise sämtliche für das erfundungsgemäße Verfahren benötigten Reagenzien. Als Lösungsmittel kommen Wasser, wasserlösliche organische Lösungsmittel, wie z. B. Methanol, Ethanol, Aceton oder Dimethylformamid oder Mischungen aus Wasser mit solchen organischen Lösungsmitteln in Frage. Aus Haltbarkeitsgründen kann es vorteilhaft sein, die für den Test benötigten Reagenzien auf zwei oder mehr Lösungen zu verteilen, die erst bei der eigentlichen Untersuchung vermischt werden. Letzteres kann insbesondere dann zutreffen, wenn nach Oxidation des Analyten der reduzierte Elektronenakzeptor in einer Folgereaktion, z. B. einer oxidativen Kupplungsreaktion weiter umgesetzt wird. Typische Konzentrationen für die im erfundungsgemäßen Mittel eingesetzten Elektronenakzeptoren sind: 0,01 - 100 mMol/l, bevorzugt 0,1 - 25 mMol/l. Reagenzien für Folgereaktionen werden mindestens im stöchiometrischen Verhältnis zu den Elektronenakzeptoren eingesetzt, bevorzugt in einem Überschuss, insbesondere in einem 2 - 10fachen Überschuss.

Das erfundungsgemäße Mittel kann auch in Form eines Teststreifens vorliegen. Solche Teststreifen sind in vielen Ausführungsarten bekannt, beispielsweise aus EP-A-0 016 387, DE-A-32 47 608, EP-A-0 262 445 oder EP-A-0 256 806. Allen gemeinsam ist, dass die zur Durchführung des Bestimmungsverfahrens benötigten Reagenzien auf festen Trägerschichten vorliegen. Als Trägerschichten kommen insbesondere saugfähige und/oder quellbare Materialien in Frage, die von der zu untersuchenden Probenflüssigkeit benetzt werden. Beispiele sind Gelatine, Zellulose oder Kunstfaservliese. In oder auf diesen Trägermaterialien liegen die Reagenzien in fester Form vor.

Bei Aufgabe der Probenflüssigkeit auf den Teststreifen oder Eintauchen des Teststreifens in die Probenflüssigkeit bildet sich in dem Streifen ein flüssiges Milieu aus, innerhalb dessen die Nachweisreaktion abläuft. Die durch die Reaktion verursachte Farbbildung kann visuell oder photometrisch z. B. reflexionsphotometrisch ausgewertet werden.

Ein spezieller Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Substanz aus der Gruppe der Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen + 1 und - 1 als direkten Elektronenakzeptor eines Analyt/Oxidoreduktase-Systems. Als Analyt/Oxidoreduktase-System wird in diesem Zusammenhang die für eine enzymatische Oxidationsreaktion notwendige Kombination aus Analyt und oxidierendem Enzym sowie gegebenenfalls zusammen mit für die Oxidation natürlicherweise notwendigen mit dem Enzym zusammenwirkenden Coenzymen, wie Flavin oder PQQ oder/und Cofaktoren, wie beispielsweise Matallsalzen, verstanden. Es wurde gefunden, dass Substanzen aus der Gruppe der Nitrosoverbindungen, N-Oxide, Hydroxylamine und Oxime, vorzugsweise Nitrosoverbindungen, N-Oxide und Oxime ganz allgemein als farbbildende Elektronenakzeptoren bei der Oxidation eines Analyten mittels einer Oxidoreduktase eingesetzt werden können.

Die vorliegende Erfindung bietet den Vorteil, dass keine Reduktionskatalysatoren, wie Diaphorase oder N-Methylphenaziniummethosulphat zur Reduktion eines farbbildenden Elektronenakzeptors notwendig sind. Dessen Reduktion kann nun direkt durch das Analyt/Enzym-System erfolgen. Eventuelle störende Nebenreaktionen können so vermieden werden.

Insbesondere im Falle des Einsatzes von Oxidasen zur enzymatischen Oxidation von Analyten wird durch Einsatz der erfundungsgemäßen Verbindungen die Bildung von Wasserstoffperoxid als Vorstufe eines kolorimetrischen Bestimmungsverfahrens vermieden. Dies beseitigt oder vermindert den störenden Einfluss reduzierend wirkender

Verbindungen.

Schliesslich bieten die erfindungsgemäss angewendeten Verbindungen eine echte Alternative überall dort, wo der Zutritt von Luftsauerstoff limitiert oder unerwünscht ist. Sauerstoff kann als Elektronenakzeptor bei enzymatischen Oxidationen durch diese Verbindungen ersetzt werden. Ganz besondere Vorteile bietet dies bei erfindungsgemässen Mitteln in Form von Teststreifen. Während diese bisher besonders bei hohen Analytkonzentrationen so aufgebaut sein mussten, dass bei enzymatischen Oxidationen mittels Oxidase Luft sauerstoff Zutritt zu der auf den Teststreifen aufgebrachten Reagenzmischung hat, können nun Teststreifen konstruiert werden, die besonders schnell und zuverlässig arbeiten. Während so bisher bei Filmteststreifen oft die Probe nach Aufgabe auf den Teststreifen nach einer bestimmten Zeit wieder abgewischt werden musste, damit Sauerstoff überhaupt in den Teststreifen eindiffundieren konnte, ist diese Massnahme bei Benutzung der erfindungsgemässen Elektronenakzeptoren nicht nötig. Dadurch, dass die zeitabhängige Diffusion von Sauerstoff in den Teststreifen vermieden wird, werden bei kinetischen Messungen von der Analytkonzentration abhängige Reaktionsgeschwindigkeiten und bei Endpunktmessungen im Endpunkt von der Analytkonzentration unabhängige Reaktionsgeschwindigkeiten erhalten, die schnellere, zuverlässigere und einfachere Bestimmungsverfahren erlauben, als es bisher möglich war.

Die nachfolgenden Beispiele zeigen einige der möglichen Verfahrensvarianten zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation.

Beispiel 1

Reduktion von N-Oxiden durch Oxidasen bzw. nicht-NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen und deren Substrate

A)

40g Polyvinylpropionat (z. B. Propofan 70 F, BASF AG, Ludwigshafen, Bundesrepublik Deutschland)

45 g Natrium-Alginat (z. B. Algipon von Kelco, Division of Merck & Co., Clark, New Jersey, USA), 1,7 Gew.-% in Wasser

2,5 g Proteinhydrolysat (z. B. Crotein C, Croda GmbH, Nettetal, Bundesrepublik Deutschland)

10 ml Tris-Puffer 0,1 M, pH 7,5

750 IU Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4) und

1 ml Resazurin 0,1 M in Wasser

wurden zu einer homogenen Masse verrührt, auf einseitig matte Polycarbonat-Folie (z. B. Pokalon, Lonza, Rheinfelden, Bundesrepublik Deutschland) 140 μ m d μ ck aufgerakelt (Rakelspalt 200 μ m) und bei 50 $^{\circ}$ C 30 Minuten lang getrocknet.

Bei Aufgabe einer glucosehaltigen Lösung (40 mg/dl) auf einen solchen Film verfärbte sich die Reagenzschicht innerhalb 1 Minute von blau nach rot. Die Anwesenheit von 20 mg/dl Harnsäure und 20 mg/dl Glutathion führte zu keiner Störung der Farbreaktion. Bei Aufgabe von Lösungen, die keine Glucose enthielten, behielt die Reagenzschicht die Farbe, die sie vor dem Probenauftrag hatte. Sie blieb blau.

Statt mit Glucose und Glucose-Oxidase wurde das gleiche farbliche Ergebnis auch mit Pyruvat und Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.3.3.)

Lactat und Lactat-Oxidase (EC 1.1.3.2.)

Glycerin-3-phosphat und Glycerin-3-phosphat-Oxidase (EC 1.1.3.21) erzielt. B)

Wurden bei der Herstellung des vorstehend beschriebenen Films statt Resazurin die folgenden Benzofuroxane EMI23.1

a) $R<1> = R<2>:H$

b) $R<1>:H; R<2>:CO-CH_3$ (Herstellung nach N. R. Ayyangov, Synthesis 1987, 616)

c) $R<1>:H; R<2>:CHO$ (Herstellung nach M. L. Edwards, J. Het. Chemistry 13, 653 (1976))

d) $R<1> = R<2>:CH_3$ (Herstellung nach J. A. Usta et al., J. Het. Chemistry 18, 655 (1981))

in einer Konzentration von 250 mg pro Filmansatz eingesetzt, dann änderte sich die Farbe bei Anwesenheit von Glucose in der untersuchten Probe jeweils von farblos nach orange. Mit zunehmender Glucosekonzentration nahm die Farbintensität zu.

Die Anwesenheit von 20 mg/dl Harnsäure führte zu keiner Störung der Farbreaktion.

Die Substrate/Enzym-Paare:

Pyruvat/Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.3.3.)

Lactat/Lactat-Oxidase (EC 1.1.3.2.)

Glycerin-3-phosphat/Glycerin-3-phosphat-Oxidase EC 1.1.3.21)

konnten ebenfalls mit den vorgenannten Benzfuroxanen nachgewiesen werden.

Beispiel 2

Reduktion von Nitrosoverbindungen durch Glucose-Oxidase und Glucose

A)

2 000 µl 0,1 M Citronensäure/NaOH-Puffer, pH 6,0

200 µl p-Nitroso-N,N-dimethylanilin, 0,1 M in Ethanol

100 µl Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4) (2500 IU/ml) oder Glucose-Dehydrogenase (EC1.1.99.10)

200 µl Probe mit bekanntem Glucosegehalt

a) 5 mM

b) 10 mM

c) 15 mM

d) 20 mM

e) 50 mM

in Wasser

wurden gemischt und 2 Minuten bei 25 °C inkubiert. Dann wurden

250 µl N-Methylantranilsäure, 0,1 M in Ethanol,

125 µl Kaliumhexacyanoferrat(II), 0,2 M in Wasser und

125 µl Kaliumhexacyanoferrat(III), 0,2 M in Wasser

zugesetzt. Nach einer weiteren Minute wurde 25fach verdünnt und die Absorption der Reaktionsmischung, die sich bei Anwesenheit von Glucose grün färbt, bei 710 nm gegen einen Blindwert (vorstehende Reaktionsmischung ohne Glucose) gemessen. Die erhaltenen Resultate ergaben eine Gerade. Der Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{710} = 24\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kann zur Bestimmung von unbekannten Glucosekonzentrationen in Lösungen herangezogen werden.

B) Wurde bei vorstehendem Test unter A) p-Nitroso-dimethylanilin ersetzt durch

a) p-Nitroso-phenol

b) p-Nitroso-N,N-diethylanilin

c) p-Nitroso-N,N-diethanolanilin (Herstellung nach D'Amico et al., J. Amer. Chem. Soc. 81, 5957 (1959))

so wurde bei Anwesenheit von Glucose durch die Kupplung mit N-Methylantranilsäure ein Farbwechsel von

a) braun nach blau

b) gelb nach grün

c) gelb nach grün

beobachtet.

C) Wurde bei vorstehendem Test unter A) N-Methylantranilsäure ersetzt durch

a) N-Methyl-N-methylenphosphonsäure-anilin

b) 1-Hydroxy-naphthalin-2-carbonsäure

c) Anilin-2-sulfonsäure

so wurde bei Anwesenheit von Glucose durch die Kupplung mit p-Nitroso-N,N-dimethylanilin eine Farbe mit

a) $\lambda_{\text{max}} = 735 \text{ nm}$

b) $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$

c) $\lambda_{\text{max}} = 640 \text{ nm}$
beobachtet.

Im Falle des Einsatzes von p-Nitroso-N,N-dimethylanilin und N-Methyl-N-methylenphosphonsäure-anilin wurde die in Fig. 1 wiedergegebene Abhängigkeit der Änderung der Lichtabsorption bei 735 nm von der Glucose-Konzentration gefunden. Hierzu wurde die Extinktion nach (1+24)-Verdünnung in Citratpuffer, pH 6 gemessen und gegen die Glucosekonzentration im Testansatz aufgetragen.

Beispiel 3

Nachweis von Glucose durch Bildung metallischen Silbers

Der Ansatz aus Citratpuffer, p-Nitroso-N,N-dimethylanilin, Glucose-Oxidase und Probe wie in Beispiel 2 A wurde 2 Minuten bei 25°C inkubiert und mit 250 μl 100 mM Silbernitrat-Lösung in Wasser sowie 250 μl Goldsol in Wasser versetzt.

(Die Herstellung von Goldsol erfolgte nach folgender Vorschrift: Zu 100 ml kochendem destilliertem Wasser werden nacheinander 0,4 mg HAuCl₄ in 0,4 ml Wasser; 0,2 ml 0,1 M NaSCN in Wasser und 0,5 ml 0,1 M K₂CO₃ in Wasser gegeben. Nach 10 Minuten wird abkühlen gelassen).

Mit den ohne Zwischenverdünnung erhaltenen Resultaten bei 700, 850 und 1300 nm wurden die in Figur 2 wiedergegebenen Kurven erhalten. Sie können als Eichkurven zur Ermittlung des unbekannten Glucosegehalts in Lösungen dienen.

Beispiel 4

Nachweis von Glucose durch Molybdänblau-Bildung

Zu einer Lösung von 200 mg 2,18-Phosphormolybdänsäure (Herstellung z. B. möglich nach G. Brauer, "Handbuch der präparativen Anorganischen Chemie", Enke-Verlag, Stuttgart, S. 1278 (1954) oder A. Rosenheim, A. Traube, Z. Anorg. Chemie 65, 99 (1910) in 920 -x μl 1 0,1 M Citronensäure/NaOH-Puffer pH 5,5 wurden 40 μl 1 0,1 M p-Nitroso-N,N-dimethylanilin (in Ethanol) sowie 40 μl 1 Glucose-Oxidase (6250 IU/ml Wasser) zugesetzt. 1 Minute nach Zugabe von x μl (x = 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10) einer glucosehaltigen Probe bekannten Glucosegehaltes (1M) wurde auf 50 ml verdünnt und die Absorptionsänderung (ΔE) bei 820 nm gemessen. Als Resultat wurde die in Fig. 3 wiedergegebene Kurve erhalten. Sie kann als Kurve zur Ermittlung des unbekannten Glucosegehalts von Lösungen dienen, wobei C die Konzentration in der Probe vor der zur Messung durchgeführten Verdünnung darstellt.

Beispiel 5

Kinetische Bestimmung von Glucose mittels nicht-NAD(P)-abhängiger Glucosedehydrogenase

Es wurden folgende Lösungen hergestellt:
Testpuffer: 0,1 M Tris/Salzsäure, pH 7,5 enthaltend 1 % Rinderserumalbumin

Elektronenakzeptor: 0,1 M p-Nitroso-N,N-dimethylanilin in Ethanol

Indikator: 2,18-Phosphormolybdänsäure, 100 mg/ml Wasser

Enzym: Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.99.17), 50 IU/ml Testpuffer

Glucose-Lösung:

- a) 36 mg Glucose/dl Humanplasma
- b) 72 mg Glucose/dl Humanplasma
- c) 144 mg Glucose/dl Humanplasma
- d) 360 mg Glucose/dl Humanplasma
- e) 720 mg Glucose/dl Humanplasma
- f) 1440 mg Glucose/dl Humanplasma
- g) 3600 mg Glucose/dl Humanplasma

In eine 1 cm-Küvette wurden

1740 µl Puffer

250 µl Elektronenakzeptor

250 µl Indikator und

10 µl Glucose-Dehydrogenase

gegeben, die Mischung auf 25 °C thermostatiert und dann 250 µl Glucose-Lösung zugegeben. Mit der Zugabe der Glucose-Lösung als Startpunkt wurde die Absorptionsänderung pro Minute (DELTA E/min) bei 820 nm registriert. Es wurden die folgenden Werte erhalten:

<tb><TABLE> Columns=2

<tb>

<tb>Head Col 1: Glucose-Konzentration (Endkonzentration im Test-Ansatz)

<tb>Head Col 2: DELTA E/min

<tb><SEP>3,6 mg/dl<SEP>0,20

<tb><SEP>7,2 mg/dl<SEP>0,38

<tb><SEP>14,4 mg/dl<SEP>0,57

<tb><SEP>36 mg/dl<SEP>1,00

<tb><SEP>72 mg/dl<SEP>1,60

<tb><SEP>144 mg/dl<SEP>2,24

<tb><SEP>360 mg/dl<SEP>3,13

<tb></TABLE>

Beispiel 6

Teststreifen zum Glucosenachweis durch Molybdänblau-Bildung

1 g Natrium-Alginat (z. B. Algipon von Kelco, Division of Merck & Co., Clark, New Jersey, USA)

45 g Polyvinylpropionat (z. B. Propiophan 70D von BASF, Ludwigshafen, Bundesrepublik Deutschland)

0,75 g Natrium-nonylsulfat

10,15 g Kalium-dihydrogenphosphat und

58,5g destilliertes Wasser

4 g Aerosil COK 84 (Degussa, Hanau, Deutschland/BRD)

werden zu einer homogenen Masse verrührt und mit 10 N Natronlauge auf pH 5,5 eingestellt.

Anschliessend wurden dann

65 mg Glucose-Oxidase (250 IU/mg),

260 mg p-Nitroso-N,N-dimethylanilin

1,3 g 2,18-Phosphormolybdänsäure

zugesetzt.

Die Masse wurde in 320 μm m Schichtdicke auf eine 1 mm dicke Polystyrolfolie aufgerakelt und 1 Stunde bei 60 $^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Bei Aufgabe eines Tropfens einer glucosehaltigen Lösung tritt innerhalb einer Minute eine deutliche Grünfärbung auf. Die Intensität der Färbung verstärkt sich mit zunehmender Glucosekonzentration und kann visuell anhand einer Vergleichsskala oder reflexionsphotometrisch ausgewertet werden.

Statt des Elektronenakzeptors p-Nitroso-N,N-dimethylanilin konnte auch p-Benzochinon-dioxim oder p-Nitroso-N,N-diethanolanilin eingesetzt werden.

Bei Aufbewahrung im Dunkeln bei Raumtemperatur ist die Verfärbung über mehrere Wochen stabil.

Ersetzt man in obigem Beispiel p-Nitroso-N,N-dimethylanilin durch Peroxidase (100 mg; 200 IU/mg) und Phosphormolybdänsäure durch 3,3 min ,5,5 min -Tetramethylbenzidin (300 mg), so erhält man einen sauerstoffabhängigen Glucosetest, wie er prinzipiell aus dem Stand der Technik bekannt ist. Im Gegensatz zu obigem Beispiel muss dann aber die Probelösung nach Aufgabe auf den Teststreifen abgewischt werden, damit Sauerstoff eindiffundieren kann und überhaupt Färbung eintritt. Zusätzlich zu diesem Nachteil wird die Endfärbung mit höherer Glucosekonzentration immer langsamer erreicht und die erzeugte Farbe ist weniger lagerstabil. Die Vorteile des Ersatzes von Sauerstoff durch erfindungsgemäße Elektronenakzeptoren sind somit:

- kein Abwischen der Probe nach Aufgabe auf den Teststreifen nötig
- schnellere Reaktion
- bei kinetischer Messung von der Analytkonzentration abhängige Reaktionsgeschwindigkeit
- bei Endpunktmessung im Endpunkt von der Analytkonzentration unabhängige Reaktionsgeschwindigkeit
- stabilerer Farbstoff

Beispiel 7

Nachweis von Glucose mit nicht-NAD(P)-abhängiger Glucosedehydrogenase und Resazurin

Zu 2050 μl 1 Testpuffer (0,2 M Citrat, 1 Gew.-% Albumin, pH 7,0) und 100 μl 1 Elektronenakzeptorlösung (10 mM Resazurin in Wasser) wurden in einer Küvette 250 μl 1 Probelösung (CGlucose = 0 bis 0,5 mM) und 100 μl 1 Enzmylösung (Glucosedehydrogenase (EC 1.1.99.17) 200 U/ml in Testpuffer) zugesetzt. Nach 2 Minuten wurde gegen einen gleichbehandelten Blindwert mit 100 μl 1 Testpuffer statt Enzmylösung die Absorption bei 530 nm gemessen. Folgende Resultate wurden erhalten:

Head Col 1 to 2: Glucosekonzentration in Head Col 3: Absorptionsänderung DELTA E530
<tb><TABLE> Columns=3
<tb>
<tb>SubHead Col 1: (mM) Küvette
<tb>SubHead Col 2: (mM) Probe
<tb> <SEP>0<SEP>0<SEP>0
<tb><SEP>0,002<SEP>0,02<SEP>0,009
<tb><SEP>0,004<SEP>0,04<SEP>0,018
<tb><SEP>0,008<SEP>0,08<SEP>0,035
<tb><SEP>0,012<SEP>0,12<SEP>0,051
<tb><SEP>0,016<SEP>0,16<SEP>0,068
<tb><SEP>0,020<SEP>0,20<SEP>0,087
<tb><SEP>0,030<SEP>0,30<SEP>0,130
<tb><SEP>0,040<SEP>0,40<SEP>0,174
<tb><SEP>0,050<SEP>0,50<SEP>0,217
<tb></TABLE>

Bis zu Probenkonzentrationen von 0,5 mM ist der Test linear. In diesem Bereich kann die Konzentration in der Küvette aus dem Extinktionskoeffizienten epsilon 530 = 4350 M cm^{-1} errechnet werden. Bei höheren Probekonzentrationen kann zwischenverdünnt oder ein kleineres Probevolumen eingesetzt werden. Niedrigere Probekonzentrationen lassen sich anhand der Fluoreszenz des Produktes Resorufin empfindlicher bestimmen.

In analoger Weise liess sich der Test mit Benzfuroxan und den in Beispiel 1 B gennanten Benzfuroxan-Derivaten sowie mit Nitroso-Verbindungen gemäss Beispiel 2 durchführen.

Mit nicht-NAD(P)-abhängiger Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.99.8) liess sich in gleicher Weise Äthanol nachweisen.

Beispiel 8

Bestimmung von Lactat mit Lactat-Oxidase und Nitrosoverbindungen als Elektronenakzeptor

In einer Küvette wurden 2240 µl Testpuffer (0,2 M Citronensäure/Natriumhydroxid, pH 6,35), 5 µl Elektronenakzeptor (0,1 M N,N-Dimethyl-p-nitroso-anilin in Äthanol) und 250 µl Probe mit bekannten Lactat-Konzentrationen gemischt und auf 25 °C thermostatisiert. Der Test wurde mit 5 µl Enzymlösung (Lactat-Oxidase (*pediococcus* sp.) 200 U/ml Testpuffer) gestartet und die Extinktionsänderung DELTA E/min bei 390 nm registriert. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

<tb><TABLE> Columns=2

<tb>

<tb>Head Col 1: CLactat:mM

<tb>Head Col 2: DELTA E/min

<tb><SEP>0<SEP>0

<tb><SEP>0,1<SEP>0,093

<tb><SEP>0,2<SEP>0,182

<tb><SEP>0,3<SEP>0,250

<tb><SEP>0,5<SEP>0,343

<tb><SEP>1,0<SEP>0,443

<tb><SEP>3,0<SEP>0,508

<tb></TABLE> CLactat ist hierbei die Lactat-Konzentration, die sich bei Durchführung der Messung in der Küvette befindet.

Der Test konnte durch Änderungen von Elektronenakzeptorkonzentration, Enzymkonzentration, Beobachtungswellenlänge und Temperatur beschleunigt oder verlangsamt werden. Als Elektronenakzeptoren konnten auch N,N-Diäthyl-p-nitrosoanilin, N,N-Bis(2-hydroxyäthyl)-p-nitrosoanilin, Benzfuroxan und Resazurin verwendet werden.

.....
Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

Claims of EP0354441

Translate this text

1. Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation des Analyten in Gegenwart eines Elektronenakzeptors und Bestimmung des reduzierten Elektronenakzeptors durch Farbbildung als Mass für die Menge des Analyten, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt mit einer entsprechenden Oxidoreductase in Anwesenheit einer Substanz aus der Gruppe der Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen +1 und -1 als direktem Elektronenakzeptor oxidiert wird.
2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Elektronenakzeptor eine Verbindung aus der Gruppe der N-Oxide, Nitrosoverbindungen, Hydroxylamine und Oxime eingesetzt wird.
3. Verfahren gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Elektronenakzeptor ein aromatisches N-Oxid eingesetzt wird.
4. Verfahren gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Elektronenakzeptor Nitrosobenzol, ein aromatisches Oxim oder ein im aromatischen Bereich substituiertes Derivat der vorgenannten Verbindungen eingesetzt wird.
5. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Oxidoreduktase eine Oxidase oder eine nicht-NAD (P)-abhängige Dehydrogenase ist.
6. Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten durch enzymatische Oxidation des Analyten, enthalten eine Oxidoreductase und einen farbbildenden Elektronenakzeptor, dadurch gekennzeichnet, dass der farbbildende Elektronenakzeptor eine direkt mit dem Analyt/Enzym-System reagierende Substanz aus der Gruppe der Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen +1 und -1 ist.
7. Mittel gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Elektronenakzeptor eine Verbindung aus der Gruppe der N-oxide, Nitrosoverbindungen, Hydroxylamine und Oxime ist.
8. Mittel gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Elektronenakzeptor ein aromatisches N-Oxid ist.
9. Mittel gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Elektronenakzeptor Nitrosobenzol, ein aromatisches Oxim oder ein Derivat der vorgenannten Verbindungen, welches deren Strukturmerkmale beinhaltet, ist.
10. Mittel gemäss einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Oxidoreductase eine Oxidase oder eine NAD(P)-unabhängige Dehydrogenase ist.
11. Mittel gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Oxidase flavinabhängig ist.
12. Verwendung einer Substanz aus der Gruppe der Verbindungen mit Stickstoff in einer Oxidationsstufe zwischen +1 und -1 als direkter Elektronenakzeptor einer Analyt/Oxidoreductase-Systems.
13. Verwendung einer Substanz aus der Gruppe der N-Oxide, Nitrosoverbindungen, Hydroxylamine und Oxime als farbbildendem Elektronenakzeptor bei der Oxidation eines Analyten mittels einer Oxidoreductase.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide